

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

20.12.2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2 0 0 3 年 1 2 月 1 2 日

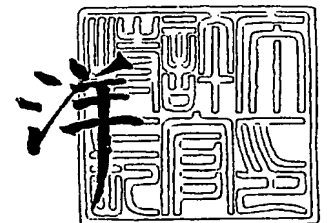
出 願 番 号
Application Number: 特 願 2 0 0 3 - 4 1 5 3 0 4
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 3 - 4 1 5 3 0 4]

出 願 人
Applicant(s): アークレイ株式会社

2 0 0 5 年 2 月 3 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



出証番号 出証特 2 0 0 5 - 3 0 0 6 2 7 2

【書類名】 特許願
【整理番号】 R8581
【提出日】 平成15年12月12日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 C12N 9/06
【発明者】
 【住所又は居所】 京都府京都市南区東九条西明田町 5 7 番地 アークレイ株式会社
 内
 【氏名】 平井 香
【特許出願人】
 【識別番号】 000141897
 【氏名又は名称】 アークレイ株式会社
【代理人】
 【識別番号】 110000040
 【氏名又は名称】 特許業務法人池内・佐藤アンドパートナーズ
 【代表者】 池内 寛幸
 【電話番号】 06-6135-6051
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 139757
 【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 要約書 1
 【包括委任状番号】 0107559

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

プロテアーゼによって試料中の測定対象物である糖化アミンを分解する工程と、
フルクトシルアミノ酸オキシダーゼを前記糖化アミンの分解物に作用させて酸化還元反応を行う工程と、

前記酸化還元反応を測定することにより、前記測定対象糖化アミンの量を決定する工程を含む糖化アミンの測定方法であって、

さらに、前記測定対象糖化アミンの分解工程に先立ち、前記試料中に測定対象糖化アミンとは別に存在する非測定対象物である糖化アミンの影響を除去することを目的として、前記フルクトシルアミノ酸オキシダーゼを前記非測定対象糖化アミンに作用させる工程を含み、

前記フルクトシルアミノ酸オキシダーゼによって、前記酸化還元反応を行うことを特徴とする糖化アミンの測定方法。

【請求項 2】

前記フルクトシルアミノ酸オキシダーゼが、糖化された α -アミノ基に特異的に作用する酵素、糖化されたアミノ酸残基側鎖に特異的に作用する酵素、または、糖化された α -アミノ基および糖化されたアミノ酸残基側鎖に特異的に作用する酵素である請求項 1 記載の測定方法。

【書類名】明細書

【発明の名称】糖化アミンの測定方法

【技術分野】

【0001】

本発明は、酸化還元反応を用いて、糖化タンパク質等の糖化アミンを測定する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

血球中の糖化ヘモグロビン (HbA1c) は、その濃度が生体血糖値の過去の履歴を反映することから、糖尿病診断や治療等における重要な指標とされている。このHbA1cの測定は、一般に、免疫学的方法、HPLC法等によって行われている。

【0003】

しかしながら、全血や血球中には、測定対象である糖化ヘモグロビン以外にも、非測定対象物として、糖化アミン (例えば、糖化アルブミン、糖化ペプチドおよび糖化アミノ酸等) 等の種々の糖化物が存在するため、このような測定対象物以外の糖化物をも測定してしまうために、真値よりも高い測定値が得られたり、偽陽性を示すという問題がある。

【0004】

このような問題を解決するために、前記免疫学的方法においては、例えば、以下のような方法が提案されている。すなわち、測定対象物と抗測定対象物抗体との主反応に先立って、非測定対象物と抗非測定対象物抗体とのコンプレックスを形成させ、非測定対象物の構造を、糖化ヘモグロビンの免疫反応に影響しないものに変化させる方法や (例えば、特許文献1参照)、B/F分離によって、試料から非測定対象物を分離除去する方法等である。また、HPLC法においては、例えば、1つの試料について2本のHPLCカラムを準備し、1本目のカラムで試料から非測定対象物を除去し、2本目のカラムで測定対象物の分離分析を行う方法が提案されている。

【0005】

しかしながら、前記免疫学的方法によると、高コストであり、また、主反応とは別の抗原抗体反応をさらに必要とするため、反応系の環境設定が複雑化し、測定に長時間を要するという問題がある。また、B/F分離については、操作が煩雑になることが明らかである。さらに、抗体は特異性を有する物質 (抗原) に対してのみ効果を奏するため、試料に含まれる非測定対象物の種類が不明である場合や、その種類が多数である場合等、十分に非測定対象物の影響を排除することは困難である。また、HPLC法においても、2本のカラムを使用するため高コストは回避し難く、また、非測定対象物の分離に時間を有するため、測定精度の向上を目的した場合、測定時間の短縮には限度がある。

【0006】

一方、近年、糖化ヘモグロビンをはじめとする各種糖化タンパク質の測定に、酸化還元反応を利用した酵素法が広く適用されており、実用化が図られている。具体的には、以下示すようにして測定されている。

【0007】

まず、血球を溶血させた試料を調製し、この溶血試料にプロテアーゼを添加して、糖化ヘモグロビン分解物を生成させる。さらに、この分解物にフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ (以下、「F A O D」という) を添加し、これを糖化ヘモグロビンの糖化部分に作用させて酸化還元反応により過酸化水素を発生させる。この過酸化水素量は前記糖化タンパク質量に対応する。そして、この反応液にペルオキシダーゼ (以下、「P O D」という) および酸化により発色する基質を添加し、前記発色性基質を発色させる。この発色を測定することにより前記過酸化水素量を測定でき、この結果、血球中の糖化ヘモグロビンを測定できるのである。

【0008】

このような酵素法においても、前述と同様に、試料中に含まれる非測定対象物である糖化物が原因となり、真値よりも高い値を示すという問題がみられる。そこで、この問題を

解決するために、酵素法においても次のような方法が本出願人により提案されている（例えば、特許文献2）。

【0009】

すなわち、第1の方法として、予め、糖化ヘモグロビンへの反応性が低いFAOD（分解用FAOD）を試料に添加することにより、非測定対象の糖化物を処理しておき、その後、糖化ヘモグロビンのプロテアーゼ分解物を、糖化ヘモグロビンへの反応性が高いFAOD（測定用FAOD）で処理することによって測定する方法が提案されている。

【0010】

また、第2の方法として、予め、糖化ヘモグロビンへの反応性が高い少量のFAOD（分解用FAOD）で試料を前処理した後、この試料をプロテアーゼで処理し、再度、前述と同じFAOD（測定用FAOD）を添加する方法が提案されている。この第2の方法において、分解用FAODの添加量を少量とする、詳しくは、測定用FAODに対する前処理用FAODの比を小さくするのは、速度論の点から、前処理の段階で糖化HbがFAODと反応することを防止するためである。さらに、前記第2の方法におけるプロテアーゼの添加は、前記糖化ヘモグロビンを分解させることを目的とするだけでなく、初めに添加したFAODを失活させることも目的としている。なぜなら、初めに添加したFAODが残存すると、プロテアーゼの添加によって生成された糖化ヘモグロビン分解物が残存FAODと反応してしまうからである。

【特許文献1】特開2000-180439号公報

【特許文献2】国際公開第03-033729号パンフレット

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

しかしながら、従来の第1の酵素法によると、予め前処理用FAODにより非測定対象物に対する前処理を行っても、主反応に使用する測定用FAODは異なる触媒機能であるために、このFAODに作用する非測定対象物は処理し切れてない状態となる。このため、測定精度の向上は見られるものの、より一層の測定精度の向上が求められている。また、第1の酵素法では、（1）前処理FAOD、（2）プロテアーゼ、（3）測定用FAOD（+ペルオキシダーゼ）の3種類の試薬をそれぞれ使用した三段階の反応が必須となるため、測定に時間がかかり、試薬の調製にも手間がかかる。

【0012】

一方、従来の第2の酵素法では、前述のように、前処理FAODの添加量を少量とする必要があり、かつ、測定用FAODの添加に先立って、前処理FAODをほぼ完全に失活させることが重要となる。しかし、前処理FAODを少量とすると、非測定対象物を消化するために十分な処理時間の確保が必要となり、完全な消化を試みると、処理時間が長くなり、ひいては全測定時間が長くなるという問題がある。さらに、前処理FAOD、プロテアーゼ、測定用FAODによる各処理は、いずれも同時に行うことができないことも、測定時間に影響を与えている。

【0013】

そこで、本発明は、糖化アミンの測定方法の提供であって、これにより、容易且つ簡便に、信頼性に優れた糖化アミンの測定を可能にすることを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0014】

前記目的を達成するために、本発明の糖化アミン測定方法は、プロテアーゼによって試料中の測定対象物である糖化アミンを分解する工程と、

FAODを前記糖化アミンの分解物に作用させて酸化還元反応を行う工程と、

前記酸化還元反応を測定することにより、前記測定対象糖化アミンの量を決定する工程とを含む糖化アミンの測定方法であって、

さらに、前記測定対象糖化アミンの分解工程に先立ち、前記試料中に測定対象糖化アミンとは別に存在する非測定対象物である糖化アミンの影響を除去することを目的として、

前記FAODを前記非測定対象糖化アミンに作用させる工程を含み、前記FAODによって、前記酸化還元反応を行うことを特徴とする。なお、本発明において測定対象物である糖化アミンは、以下、「測定対象糖化アミン」と、非測定対象物である糖化アミンは、「非測定対象糖化アミン」といい、非測定対象糖化アミンに対するFAOD反応を「前処理反応」、測定対象糖化アミンに対するFAOD反応を「主反応」ともいう。

【0015】

前記FAODは一般名称であって、その基質特異性はFAODの種類により様々であり、糖化アミノ酸だけでなく、糖化ペプチドや糖化タンパク質にも作用し得る酵素である。また、前記糖化アミンとしては、例えば、糖化タンパク質、糖化ペプチド、糖化アミノ酸等が含まれるが、本発明において「測定対象糖化アミン」とは、糖化タンパク質または糖化ペプチドを示す。

【発明の効果】

【0016】

本発明者らは、糖化Hbをはじめとする糖化アミンの測定方法について鋭意研究を行った結果、試料に予めFAODを添加することによって非測定対象糖化アミンを処理した後、プロテアーゼを添加して、このプロテアーゼによる測定対象糖化アミンの分解物に、すでに添加されているFAODを作用させるという本発明に想到した。この方法によれば、第1に、予め試料に添加したFAODによって、測定対象物と非測定対象物とを処理するため、主反応を行う際に、FAODと作用する非測定対象物はすでに消化されることとなる。したがって、非測定対象物が原因となる偽陽性や測定値の上昇（高値化）を防止し、著しく優れた測定精度を確保できるのである。また、本発明によれば、予めFAODによって非測定対象糖化アミンを処理さえすれば、その後は、後述するように、プロテアーゼによる測定対象物の分解、酸化還元反応等は、経時的に行ってもよいし同時に行うこともできる。このため、測定における反応工程数を極めて少ない2工程にまで減少することができ、簡便な操作が可能になる。また、臨床検査だけでなく食品分析等にも広く適用されている従来の酵素法においては、サンプルをプロテアーゼで処理した後に、主反応の酵素を添加することが基本形態であり、本発明のように、プロテアーゼ添加に先立って主反応のFAODを添加することも本発明者らが初めて見出したことである。したがって、このような本発明の測定方法を前述のような糖化ヘモグロビンの測定に適用すれば、糖化ヘモグロビンの糖尿病診断の指標としての信頼性も増し、臨床医療等の分野において有用な方法となる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0017】

本発明の測定方法は、前述のように、プロテアーゼによって試料中の測定対象物である糖化アミンを分解する工程と、FAODを前記糖化アミンの分解物に作用させて酸化還元反応を行う工程と、前記酸化還元反応を測定することにより、前記測定対象糖化アミンの量を決定する工程とを含む糖化アミンの測定方法であって、

さらに、前記測定対象糖化アミンの分解工程に先立ち、前記試料中に測定対象糖化アミンとは別に存在する非測定対象物である糖化アミンの影響を除去することを目的として、前記FAODを前記非測定対象糖化アミンに作用させる工程を含み、前記FAODによって、前記酸化還元反応を行うことを特徴とする。つまり、前記FAODを前記非測定対象糖化アミンに作用させる工程において添加したFAODによって、酸化還元反応を行うことができる。

【0018】

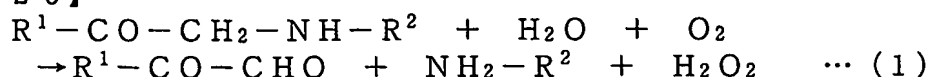
前記測定対象物としては、前述のような酸化還元反応を利用できる糖化アミンであれば特に制限されず、本発明の測定方法による測定が可能である。具体的な測定対象糖化アミンとしては、糖化ヘモグロビン、糖化アルブミン等の糖化タンパク質、糖化ペプチドがあげられ、本発明の測定方法は、中でも糖化ヘモグロビンの測定に有用である。

【0019】

本発明の測定方法において使用するFAODは、下記式(1)に示す反応を触媒するF

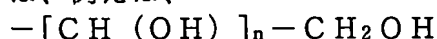
AODであることが好ましく、例えば、 α -アミノ基が糖化された糖化アミンに特異的に作用するFAOD（以下、「FAOD- α 」という）、アミノ酸側鎖のアミノ基が糖化された糖化アミンに特異的に作用するFAOD（以下、「FAOD-S」という）、 α -アミノ基が糖化された糖化アミンおよびアミノ酸側鎖のアミノ基が糖化された糖化アミンのいずれにも特異的に作用するFAOD（以下、「FAOD- α S」という）等があげられる。

【0020】



【0021】

前記式(1)において、 R^1 は、水酸基もしくは糖化反応前の糖に由来する残基（糖残基）を意味する。前記糖残基（ R^1 ）は、反応前の糖がアルドースの場合はアルドース残基であり、反応前の糖がケトースの場合、ケトース残基である。例えば、反応前の糖がグルコースの場合は、アマドリ転位により、反応後の構造はフルクトース構造をとるが、この場合、糖残基（ R^1 ）は、グルコース残基（アルドース残基）となる。この糖残基（ R^1 ）は、例えば、



で示すことができ、 n は、0～6の整数である。

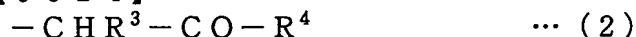
【0022】

前記式(1)において、 R^2 は、特に制限されないが、糖化アミンが糖化アミノ酸または糖化ペプチド（糖化タンパク質を含む）の場合、 α -アミノ基が糖化されている場合と、それ以外のアミノ基（アミノ酸側鎖のアミノ基）が糖化されている場合とで異なる。

【0023】

前記式(1)において、 α -アミノ基が糖化されている場合、 R^2 は、下記式(2)で示すアミノ酸残基またはペプチド残基である。この場合に前記式(1)の反応を特異的に触媒するのが前記FAOD- α およびFAOD- α Sである。

【0024】



【0025】

前記式(2)において、 R^3 はアミノ酸側鎖基を示し、 R^4 は水酸基、アミノ酸残基またはペプチド残基を示し、例えば、下記式(3)で示すことができる。下記式(3)において、 n は、0以上の整数であり、 R^3 は、前述と同様に、アミノ酸側鎖基を示し、アミノ酸側鎖基は全て同一でも、異なっても良い。

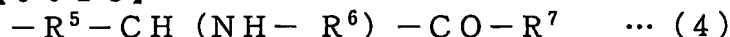
【0026】



【0027】

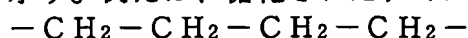
また、前記式(1)において、 α -アミノ基以外のアミノ基が糖化されている（アミノ酸側鎖基が糖化されている）場合、 R^2 は下記式(4)で示すことができる。この場合に前記式(1)の反応を特異的に触媒するのが前記FAOD-SおよびFAOD- α Sである。

【0028】



【0029】

前記式(4)において、 R^5 は、アミノ酸側鎖基のうち、糖化されたアミノ基以外の部分を示す。例えば、糖化されたアミノ酸がリジンの場合、 R^5 は



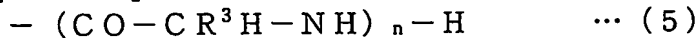
であり、

例えば、糖化されたアミノ酸がアルギニンの場合、 R^5 は、
 $-CH_2-CH_2-CH_2-NH-CH(NH_2)-$
 である。

【0030】

また、前記式(4)において、 R^6 は、水素、アミノ酸残基またはペプチド残基であり、例えば、下記式(5)で示すことができる。なお、下記式(5)において、 n は0以上の整数であり、 R^3 は、前述と同様にアミノ酸側鎖基を示し、アミノ酸側鎖基は全て同一でも、異なっても良い。

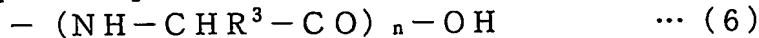
【0031】



【0032】

また、前記式(4)において、 R^7 は、水酸基、アミノ酸残基またはペプチド残基であり、例えば、下記式(6)で示すことができる。なお、下記式(6)において、 n は0以上の整数であり、 R^3 は、前述と同様にアミノ酸側鎖基を示し、アミノ酸側鎖基は全て同一でも、異なっても良い。

【0033】



【0034】

前記糖化 α -アミノ基に特異的に作用するFAOD- α としては、例えば、市販の商品名フルクトシル-アミノ酸オキシダーゼ(FAOX-TE)(キッコーマン社製)、ペニシリウム属由来FAOD(特開平8-336386公報)等があげられる。前記糖化されたアミノ酸側鎖に特異的に作用するFAOD-Sとしては、例えば、フサリウム属由来FAOD(日本生物工学会大会 平成12年度「Fusarium oxysporum由来アミノ酸オキシダーゼの基質特異性の変換; 藤原真紀 他」)等があげられる。また、前記糖化 α -アミノ基および糖化アミノ酸側鎖基の両方に作用するFAOD- α Sとしては、例えば、市販の商品名FOD(旭化成社製)、ギベレラ属由来FAOD(特開平8-154672号公報)、フサリウム属由来FAOD(特開平7-289253号公報)、アスペルギルス属由来FAOD(WO99/20039号)等があげられる。

【0035】

これらのFAODは、測定対象糖化アミンの種類に応じて適宜決定することができる。測定対象物が前述のように糖化ヘモグロビンの場合には、その β 鎖N末端バリンにおける α -アミノ基の糖化程度を測定することによってHbA1c(%)を算出できるため、糖化 α -アミノ基に特異的に作用するFAOD- α を使用することが好ましい。特に、FAOD- α である商品名FAOX-TEは、 α -アミノ基が糖化された遊離の「バリン」に特異的に作用するため、N末端配列が「Val-His-Leu...」となる β 鎖N末端バリンの糖化程度の測定に適している。また、糖化ヘモグロビンは、 α 鎖N末端バリンの糖化程度を測定することもできるため、前記FAOD- α 、特に、Fusarium sp. GL2-1(FERM BP-8451)から常套手段によって得られるFAODを使用することもできる。このFAOD- α は、 α -アミノ基が糖化された遊離のVal、Val-Leu、Val-Leu-Serに特異的に作用するため、N末端配列が「Val-Leu-Ser-Pro-Ala-Asp...」となる α 鎖のN末端バリンの糖化量測定に適している。また、測定対象物が、 α -アミノ基が糖化されたアミノ酸(糖化Val)やペプチド(糖化Val-His)、 ϵ -アミノ基が糖化されたアミノ酸(糖化Lys)やペプチド(糖化Lys-Thr、糖化Lys-Ser)等の場合には、糖化Lysおよび糖化Valに特異的に作用するFAOD- α Sを使用することが好ましい。

【0036】

前記プロテアーゼとしては、特に制限されず、メタロプロテアーゼ、プロメライン、パイン、トリプシン、プロテアーゼK、ズブチリシンおよびアミノペプチダーゼからなる群から選択された少なくとも一つのプロテアーゼが使用できるが、測定対象糖化アミンの

種類に応じて選択することが好ましく、特に、測定対象糖化アミンを選択的に分解できるプロテアーゼ、FAODが作用し易い分解物を特異的に遊離できるプロテアーゼが好ましい。これは、測定対象糖化アミンを選択的に分解できるプロテアーゼであれば、例えば、試料中に他の糖化アミン（特に、糖化タンパク質、糖化ペプチド）が存在する場合であっても、これらの糖化アミンは分解され難く、FAODが作用し易い分解物も発生しないため、測定精度をより一層向上できるからである。具体的に、測定対象物が前述のような糖化ヘモグロビンである場合は、糖化ヘモグロビンを選択的に分解するプロテアーゼが好ましく、例えば、メタロプロテアーゼ、プロメライン、パパイン、プタ臓由来トリプシン、*Bacillus subtilis*由来のプロテアーゼ等があげられ、より好ましくはメタロプロテアーゼ、*Bacillus subtilis*由来のプロテアーゼであり、特に好ましくはメタロプロテアーゼである。

【0037】

また、前述のようなFAOD- α を使用する際には、FAOD- α が作用し易い分解物、例えば、 β 鎖N末端バリリン、もしくはこれを含むペプチド（例えば、ジペプチド、トリペプチド等）を、特異的に遊離できるプロテアーゼが好ましく、ズブチリシン、プロナーゼ、アンギオテンシン変換酵素等が使用できる。具体的には、例えば、糖化Hbをズブチリシン、プロナーゼ等で処理することによってVal-His-Leuのトリペプチドを遊離でき、さらにHis-Leuに特異的なアンギオテンシン変換酵素で処理すれば、糖化バリリン（フルクトシルバリリン）を遊離することができる。

【0038】

また、フサリウム属（例えば、*Fusarium* sp. GL2-1 (FERM BP-8451)）由来のFAOD- α を使用する際には、例えば、 α 鎖N末端バリリン、もしくはこれを含むペプチド（例えば、ジペプチド、トリペプチド等）を、特異的に遊離できるプロテアーゼが好ましく、例えば、エンドプロテイナーゼASP-N等が使用できる。具体的には、例えば、糖化Hbを前記エンドプロテイナーゼASP-Nで処理することによって、Val-Leu-Ser-Pro-Ala-Aspペプチドを遊離でき、さらにカルボキシペプチダーゼYで処理することによって糖化Val-Leuを遊離できる。また、糖化アルブミンの場合は、例えば、プロテナーゼK、ズブチリシン、フィシン、エラスターゼ、サーモリシン等が使用でき、アルブミンの種類（例えば、HSA、BSA等）はその由来に何ら制限されず、測定できる。

【0039】

本発明において、測定試料は特に制限されず、例えば、全血、血漿、血清、血球、尿、髄液等の生体試料や、ジュース等の飲料水、醤油、ソース等の食品類等の試料に対しても、本発明の測定方法を適用できる。この中でも、本発明の測定方法は、例えば、前記全血、血漿、血清、血球などの血液試料やその他の生体試料に有用である。例えば、前記血球成分である糖化アミンを測定する場合には、全血をそのまま溶血させたものを試料としてもよいし、全血から赤血球を分離して、前記赤血球を溶血させたものを試料として用いてもよい。また、点滴等の成分には、例えば、グルコース等の糖類や各種アミノ酸が含まれる場合が多いため、これらの成分から糖化アミンが生成されることにより、患者の血液等に一過的に糖化アミノ酸が増加する場合がある。したがって、このような点滴後の患者の血液試料等にも本発明の測定方法は有用である。

【0040】

本発明において、前記酸化還元反応の測定は、前記FAODの酸化還元反応により発生した測定対象糖化アミン由来の過酸化水素量の測定であることが好ましく、例えば、PODによって、測定対象糖化アミン由来の過酸化水素を還元し、同時に酸化により発色する基質（発色性基質）を酸化し、前記基質の発色程度を測定することによって、前記過酸化水素の量を測定することができる。

【0041】

なお、PODの添加順序は何ら制限されず、例えば、前記プロテアーゼの添加前または添加後に添加してもよいし、前記プロテアーゼの添加と同時に添加してもよい。また、発色性基質の添加も同様に制限されない。

【0042】

つぎに、本発明の測定方法について、非測定対象物を含む全血試料における、血球由来の糖化Hbを測定する例をあげて説明する。なお、この実施形態において「糖化アミノ酸」とは、特に示さない限り、試料中に含まれる非測定対象物糖化アミノ酸のことをいい、測定対象物である糖化タンパク質のプロテアーゼ分解物としての糖化アミノ酸は含まない。

【0043】

まず、全血を溶血して溶血試料を調製する。この溶血方法は、特に制限されず、例えば、界面活性剤を用いる方法、超音波による方法、浸透圧の差を利用する方法、凍結溶解による方法等が使用できる。この中でも、操作の簡便性等の理由から、界面活性剤を用いる方法が好ましい。

【0044】

前記界面活性剤としては、例えば、ポリオキシエチレン-p-t-オクチルフェニル エーテル (Triton系界面活性剤等)、ポリオキシエチレン ソルビタン アルキル エステル (Tween系界面活性剤等)、ポリオキシエチレン アルキル エーテル (Brij系界面活性剤等) 等の非イオン性界面活性剤が使用でき、具体的には、例えば、商品名TritonX-100、商品名Tween-20、商品名Brij35等があげられる。前記界面活性剤による処理条件は、通常、処理溶液中の血球濃度が1~10体積%の場合、前記処理溶液中の濃度が0.1~1重量%になるように前記界面活性剤を添加し、室温で5秒~1分程度攪拌すればよい。

【0045】

また、前記浸透圧の差を利用する場合は、例えば、全血の体積に対し2~100倍体積量の精製水を添加して溶血させる。

【0046】

つぎに、前記溶血試料にFAODを添加する。このFAODの添加によって、前記溶血試料中の非測定対象糖化アミンであって、前記FAODの基質となり得るものが分解される。具体的には、FAODによる前記式(1)の反応によって、非測定対象糖化アミンの糖化部分が、過酸化水素の発生を伴って分解される。このように、FAODと反応可能な非測定対象糖化アミンは、この段階ですでに消去されているため、次工程において糖化Hbをプロテアーゼで分解しても、本工程において添加されたFAODと非測定対象物とが反応することはなく、糖化Hb分解物のみがFAODと反応できるのである。

【0047】

なお、この工程で発生した非測定対象由来の過酸化水素は、血球中に含まれるカタラーゼによって発生と同時に消失するため、現段階で発生した過酸化水素が、後述する糖化Hb由来の過酸化水素の測定(POD反応)に影響を及ぼすことはない。このように発生と同時に瞬時に過酸化水素が消化されることは、例えば、反応液中に含まれるHbと非測定対象物の含有割合や、反応速度論の点から考慮しても明らかであり、また、POD反応に影響を与えないことは、後述する実施例の結果からも明らかである。

【0048】

なお、試料が血球を含まない場合、すなわち血球中のカタラーゼを含まない場合には、別途カタラーゼを添加して、非測定対象糖化アミン由来の過酸化水素を消去してもよい。このように前記カタラーゼにより過酸化水素を消去した場合、後に行うFAOD処理で生成する過酸化水素までもが消去されることを防ぐために、過剰量のPODおよび発色性基質を添加することが好ましく、また、前記PODおよび発色性基質の添加は、例えば、FAODの添加前またはFAOD添加と同時であることが好ましい。この場合、PODは、前記カタラーゼの添加量(U)に対し、例えば、5~100倍の活性(U)量を添加することが好ましい。

【0049】

前記溶血試料に対するFAODの添加量は、非測定対象物の処理ならびに後述する糖化Hb分解物の処理を十分に行うことができる量であればよく、例えば、溶血試料中のHb

濃度等によって適宜決定することができるが、非測定対象物を迅速に消去するために過剰量を添加することが好ましい。具体的には、反応液において、血球濃度が0.3体積%の場合、例えば、FAOD 0.1~30 U/Lの範囲であり、好ましくは2~10 U/Lであり、より好ましくは3~6 U/Lである。また、反応液において、全血濃度が0.3体積%の場合、FAOD 0.1~45 U/Lの範囲であり、好ましくは2~15 U/Lであり、より好ましくは3~9 U/Lである。

【0050】

このFAOD処理の条件は、特に制限されないが、反応温度は、例えば、2~60℃、好ましくは4~40℃であり、反応時間は、例えば、1~30分間、好ましくは3~5分間であり、pHは、例えば、6~9の範囲である。また、この処理は、通常、緩衝液中で行われ、前記緩衝液としては、特に制限されないが、例えば、トリス塩酸緩衝液、リン酸緩衝液、EPPS緩衝液、PIPES緩衝液等があげられる。

【0051】

なお、前記溶血工程とFAODの添加工程は、別々に行ってもよいが、時間の短縮、工程の簡略化の点から、同時に行うことが好ましい。特に、試薬キットを用いた本発明の測定方法を考慮すると、溶血ならびに非測定対象糖化アミンのFAOD処理を同時に行うことによって、試薬数を低減できるため好ましい。

【0052】

続いて、前記FAODを添加した反応液に、さらにプロテアーゼ、およびPODと酸化により発色する基質（発色性基質）を添加する。このように前記プロテアーゼの添加によって、糖化Hbは、先に添加したFAODが作用し易いように分解され、この分解物とFAODとの間で前記式（1）に示す反応が起こり、糖化Hb由来の過酸化水素が発生する。そして、発生すると同時に、前記過酸化水素酸はPODにより還元され、一方、共存する前記発色性基質は酸化され、発色を呈するのである。この発色は、例えば、分光光度計等に吸光度として測定することができ、これらによって過酸化水素量を決定できる。そして、例えば、この過酸化水素濃度と検量線等とを用いて、試料中の糖化Hbの量（糖化量）を求めることができる。

【0053】

この処理は、通常、前述のような緩衝液中で行われ、条件は、使用するプロテアーゼの種類、測定対象の糖化タンパク質の種類およびその濃度等により適宜決定される。

【0054】

前記反応液中におけるプロテアーゼの濃度は、血球濃度が0.3体積%の場合、例えば、10 KU/L~300 MU/Lの範囲であり、好ましくは1 MU/L~60 MU/L、より好ましくは5 MU/L~30 MU/Lであり、前記反応液において、全血濃度が0.3体積%の場合、10 KU/L~150 MU/Lの範囲であり、好ましくは1 MU/L~30 MU/Lであり、より好ましくは5 MU/L~15 MU/Lである。

【0055】

また、前記反応液中におけるPOD濃度は、例えば、過剰量であることが好ましい。PODが過剰量であれば、発生と同時に過酸化水素と迅速に反応することができ、例えば、試料中のカタラーゼによる影響を十分に抑制できるからである。具体例としては、反応液中の血球濃度が0.3体積%の場合、例えば、0.01 KU/L~4 MU/Lの範囲であり、好ましくは0.1 KU/L~200 KU/L、より好ましくは5 KU/L~100 KU/Lであり、前記反応液において、全血濃度が0.3体積%の場合、0.01 KU/L~2 MU/Lの範囲であり、好ましくは0.1 KU/L~100 KU/Lであり、より好ましくは5 KU/L~50 KU/Lである。前記反応液中における発色性基質の濃度は、血球濃度が0.3体積%の場合、例えば、0.01~300 $\mu\text{mol/L}$ の範囲であり、好ましくは1~100 $\mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは5~30 $\mu\text{mol/L}$ である。

【0056】

この処理の条件は、特に制限されないが、反応温度は、例えば、2~60℃、好ましくは4~40℃であり、反応時間は、例えば、1~30分間、好ましくは3~10分間であ

り、pHは、例えば、6～9の範囲である。

【0057】

前記発色性基質としては、例えば、N-（カルボキシメチルアミノカルボニル）-4, 4'-ビス（ジメチルアミノ）ジフェニルアミンナトリウム、オルトフェニレンジアミン（OPD）、トリンダー試薬と4-アミノアンチピリンとを組み合わせた基質等があげられる。前記トリンダー試薬としては、例えば、フェノール、フェノール誘導体、アニリン誘導体、ナフトール、ナフトール誘導体、ナフチルアミン、ナフチルアミン誘導体等があげられる。また、前記アミノアンチピリンの他に、アミノアンチピリン誘導体、バニリンジアミンスルホン酸、メチルベンズチアゾリノンヒドラゾン（MBTH）、スルホン化メチルベンズチアゾリノンヒドラゾン（SMBTH）等も使用できる。このような発色性基質の中でも、特に好ましくは、前述のように、N-（カルボキシメチルアミノカルボニル）-4, 4'-ビス（ジメチルアミノ）ジフェニルアミンナトリウムである。

【0058】

なお、本発明において、前記プロテアーゼの添加後に、前記試料にPODおよび発色性基質を添加して、プロテアーゼ処理とPOD処理とを別個に行うこともできるが、以下の理由より、前記両処理を同時に行うことが好ましい。すなわち、第1に、プロテアーゼとともにPODと発色性基質を添加すれば、発生した過酸化水素は瞬時にPODと反応し、前述のようにカタラーゼによって消去されるおそれがないからである。第2に、前記両処理を1工程とすれば、測定をよりいっそう簡便かつ迅速に行うことができる。また、第3に、試薬キットを用いた測定を考慮すれば、工程数に応じて試薬数を低減できるため、低コスト化も可能になるからである。特に、従来の酵素法においては、通常、3工程以上の処理が必要であるため、使用する試薬も少なくとも3試薬系が必要であったが、本発明によれば、溶血および非測定対象物の除去を1工程、プロテアーゼ処理およびPOD処理を1工程とする合計2工程という、極めて少ない工程数での反応が可能であるため、溶血試薬とFAODとを含む試薬、プロテアーゼとPODと発色性基質とを含む試薬の2試薬系による測定が実現できるのである。このように2試薬系での測定が可能になったことは、コストの面、簡便性の点からも有用である。

【0059】

前記過酸化水素量は、前記POD等を用いた酵素的手法の他に、例えば、電気的手法により測定することもできる。

【実施例1】

【0060】

(I) 血球試料に非測定対象糖化アミンとして各種糖化アミノ酸を添加し、血球中のHbA1cの測定を行った。

【0061】

血球試料

健常者の血液を遠心分離（3000G、10分間）し、回収した血球に下記糖化アミノ酸水溶液と水とを添加して、ヘマトクリット値が60%である全血試料を調製した。なお、全血試料における前記糖化アミノ酸水溶液の添加割合は、0体積%、1体積%、3体積%とした。前記糖化アミノ酸水溶液は、16種類の糖化アミノ酸（フルクトシルイソロイシン、フルクトシルロイシン、フルクトシルリジン、フルクトシルメチオニン、フルクトシルフェニルアラニン、フルクトシルトレオニン、フルクトシルトリプトファン、フルクトシルバリン、フルクトシルチロシン、フルクトシルアルギニン、フルクトシルヒスチジン、フルクトシルアラニン、フルクトシルアスパラギン酸、フルクトシルプロリン、フルクトシルセリン、フルクトシルグリシン）を含む溶液であり、各糖化アミノ酸の濃度は、それぞれ約0.02～0.4w/v%とした。

【0062】

(実施例1)

以下に示す操作は、自動分析器（商品名JCA-BM8、日本電子社製）を用いて行った。まず、前記血球試料0.58μLに精製水15μLを添加した。なお、精製水を添加

したのは、後述する比較例において添加する試薬 a ($15 \mu\text{L}$) に対する容量補正のためである。続いて、前記血球試料に下記第 1 試薬を $74 \mu\text{L}$ 添加し、 37°C で約 4 分間インキュベートした後、混合溶液の吸光度を測定した (第一測定)。さらに、約 1 分後に、前記混合溶液に下記第 2 試薬を $18.5 \mu\text{L}$ 添加し、 37°C で 3 分間インキュベートした後、この反応液の吸光度を測定した (第二測定)。吸光度測定は、いずれも主波長 700 nm 、副波長 570 nm で行った。そして、第 1 測定の吸光度に $89.58/108.08$ を乗じて用量補正を行い、第二測定の吸光度と前記第 1 測定の補正した吸光度との差 ($\Delta\text{Abs.}$) を求めた。そして、血球試料における糖化アミノ酸溶液の添加量が 0 体積% の場合の $\Delta\text{Abs.}$ を 100% とした場合の、各血球試料についての $\Delta\text{Abs.}$ の相対値 (%) を算出した。この結果を実施例 1 として、下記表 1 に示す。なお、この $\Delta\text{Abs.}$ を、血液試料の HbA1c 濃度として、後に考察する。

【0063】

第 1 試薬

ホウ酸 (ナカライテスク社製)	1 mmol/L
ジベレラ属由来 F A O D (アークレイ社製)	5 KU/L
テトラゾリウム化合物 (商品名 W S T-3、同仁化学社製)	1.7 mmol/L
N a N ₃ (ナカライテスク社製)	0.66 mmol/L
ポリオキシエチレンラウリルエーテル (日本ケミカル社製)	1 g/L

【0064】

第 2 試薬

T r i s-H C l 緩衝液	300 mmol/L
P O D (東洋紡社製)	67 KU/L
発色性基質 (商品名 D A-64、和光純薬社製)	71.3 $\mu\text{mol/L}$
C a C l ₂ (ナカライテスク社製)	12.5 mmol/L
N a C l (ナカライテスク社製)	200 mmol/L
メタロプロテアーゼ	10 MU/L

【0065】

(比較例 1)

この例は、第 1 の F A O D で非測定対象糖化アミンを分解した後、異なる第 2 の F A O D を用いて測定対象 HbA1c と酸化還元反応させ、前記 HbA1c の測定を行う従来法に関する比較例である。

【0066】

前記精製水に代えて試薬 a-1 ($15 \mu\text{L}$)、前記第 1 試薬に代えて下記試薬 b ($74 \mu\text{L}$)、前記第 2 試薬に代えて下記試薬 c を添加した以外は、前記実施例 1 と同様にして吸光度の測定を行い、 $\Delta\text{Abs.}$ を求め、相対値 (%) を算出した。これらの結果を下記表 1 に示す。下記試薬 a-1 における第 1 F A O D として商品名 F A O X-T E (キッコーマン社製) を使用し、下記試薬 c における第 2 F A O D としてジベレラ属由来 F A O D (アークレイ社製) を使用した。なお、比較例 1 において前記試薬 a-1 は、血球の溶血および非測定対象糖化アミンの分解に使用する試薬であり、試薬 b は HbA1c の分解に使用する試薬であり、試薬 c は HbA1c 分解物との酸化還元反応に使用する試薬である。

【0067】

試薬 a-1

ポリオキシエチレンラウリルエーテル (日本ケミカル社製)	12 g/L
C H E S (同仁化学社製)	80 mmol/L
M O P S (同仁化学社製)	30 mmol/L
第 1 F A O D	0.3 KU/L

【0068】

試薬 b

M E S (同仁化学社製)	1 mmol/L
----------------	----------

テトラゾリウム化合物 (商品名 W S T-3、同仁化学社製)	1.7mmol/L
N a N ₃ (ナカライテスク社製)	0.66mmol/L
C a C l ₂ (ナカライテスク社製)	2.5mmol/L
N a C l (ナカライテスク社製)	50mmol/L
メタロプロテアーゼ	10MU/L

【0069】

試薬 c

T r i s-H C l 緩衝液	300mmol/L
第 2 F A O D	17.4KU/L
P O D (東洋紡社製)	67KU/L
発色性基質 (商品名 D A-64、和光純薬社製)	71.3 μ mol/L

【0070】

(比較例 2)

この例は、F A O D で非測定対象糖化アミンを分解した後、前記 F A O D をプロテアーゼで失活させ、さらに同じ F A O D を添加して測定対象 HbA1c の分解物と酸化還元反応させ、前記 HbA1c の測定を行う従来法に関する比較例である。

【0071】

前記比較例 1 における前記試薬 a-1 の第 1 F A O D をジベレラ属 F A O D (アークレイ社製) に代えた試薬 a-2 を使用した以外は、前記比較例 1 と同様にして吸光度の測定を行い、 Δ Abs. を求めて相対値 (%) を算出した。これらの結果を下記表 1 に示す。なお、比較例 2 において、試薬 a-2 と試薬 c とは同じ F A O D を使用することとなり、試薬 b は HbA1c の分解ならびに試薬 a-2 における F A O D の失活に使用する試薬である。

【0072】

(比較例 3)

なお、比較例 3 としては、前記比較例 1 における試薬 a-1 に F A O D を添加せずに精製水で用量補正した試薬 a-3 を使用した以外は、前記比較例 1 と同様にして吸光度の測定を行い、 Δ Abs. を求め、相対値 (%) を算出した。

【0073】

(表 1)

X (体積%)	相対値 (%)			
	実施例 1	比較例 1	比較例 2	比較例 3
0	100	100	100	100
1	103	152	406	1033
3	87	294	952	7513

X: 血球試料における前記糖化アミノ酸水溶液の添加割合 (体積%)

【0074】

前記表 1 に示すように、F A O D 無添加の試薬 a-3 を使用した比較例 3 は、HbA1c に対する F A O D を用いた酸化還元反応に先立って、予め試料に添加した糖化アミノ酸が排除されていないため、糖化アミノ酸溶液の添加割合の増加に伴って、 Δ Abs. の相対値の著しい上昇が確認された。特に、糖化アミノ酸溶液の添加割合が 3 体積% の場合、 Δ Abs. が約 75 倍もの値を示した。また、前記酸化還元反応に先立って、添加した糖化アミノ酸を F A O D によって処理した比較例 1 および 2 については、比較例 3 より抑制されたものの、 Δ Abs. の相対値の上昇は顕著であり、糖化アミノ酸溶液の添加割合が 3 体積% の場合、 Δ Abs. は、比較例 1 で約 3 倍、比較例 2 で約 9.5 倍の値を示した。これに対して、実施例 1 は、糖化アミノ酸溶液の添加割合を増加させても Δ Abs. の相対値には著しい変化はみられず、ほぼ一定の値を示し、糖化アミノ酸溶液の添加割合が 3 体積% の場合であっても、 Δ Abs. は 1 割程度の変化しかみられなかった。このような結果から、実施例によれば、非測定対象物であ

る糖化アミノ酸が高濃度であっても、非常に効果的な処理が可能であり、これによって測定対象糖化アミンを高精度に測定できることがわかる。

【0075】

(II) さらに、実施例1における試薬1のFAOD濃度を変化させて、前記実施例1と同様の吸光度測定を行い、 Δ Abs.の相対値を算出した(試薬1におけるFAOD濃度: 3、5、10 KU/L)。また、比較例1に関しては試薬a-1のFAOD濃度、比較例2に関しては試薬a-2のFAOD濃度をそれぞれ変化させ、同様にして Δ Abs.の相対値を算出した(前記試薬a-1および試薬a-2におけるFAOD濃度: 0.3、3、30 KU/L)。これらの結果を下記表2に示す。なお、下記表2において、FAOD濃度とは、実施例については試薬1、比較例1については試薬a-1、比較例2については試薬a-2、比較例3については試薬a-3における濃度を表す。

【0076】

(表2)

		相對值 (%)			
FAOD濃度 (KU/L)		X :	0體積 %	1體積 %	3體積 %
實施例 1	3		1 0 0	1 0 3	8 7
	5		1 0 0	1 0 3	8 7
	1 0		1 0 0	9 7	9 0
比較例 1	0 . 3		1 0 0	3 1 3	1 1 5 1
	3		1 0 0	1 5 2	2 9 4
	3 0		1 0 0	1 4 2	2 2 5
比較例 2	0 . 3		1 0 0	6 0 2	2 5 8 9
	3		1 0 0	4 0 6	9 5 2
	3 0		1 0 0	− 2 1 9	− 1 4 0 1
比較例 3	0		1 0 0	1 0 3 3	7 5 1 3

【0077】

前記表2に示すように、未処理の比較例3に対して、比較例1においては、試薬a-1におけるFAOD濃度を増加することによって、試料に添加した糖化アミノ酸を除去する能力は向上した。しかしながら、前述のように、糖化アミノ酸を除去するための試薬a-1のFAODと、測定対象HbA1cとの酸化還元反応に使用する試薬cのFAODとは、触媒機能が異なるため、試薬cのFAODが作用する糖化アミノ酸が残存し、吸光度の上昇をより一層抑制することはできなかった。また、比較例2においては、試薬a-2のFAOD濃度を増加させると、糖化アミノ酸を除去する能力は向上するが、さらにFAOD濃度を増加させると、試薬bによりプロテアーゼを添加しても、反対に前記FAODが失活することなく大量に残存するため、試薬cを添加する以前に、残存FAODとHb分解物とが反応してしまい、反対に吸光度が低下してしまうという結果となった。これに対して、実施例1は、FAODの添加割合を変化させても、これに伴う吸光度の変化は特に見られなかったため、FAODの添加量によっては、測定系が影響を受けることなく、十分な精度での測定が可能であることがわかる。

【産業上の利用可能性】

【0078】

以上のように、本発明の測定方法によれば、FAODと反応する非測定対象の糖化アミンが試料中に含まれる場合であっても、十分にその影響を排除できるため、測定精度に優れる糖化アミンの測定が実現できる。特に、従来の測定方法においては、非測定対象糖化アミンを除去するために、通常、3工程以上の処理が必要であったが、本発明の測定方法によれば、前述のように2工程のみの処理であっても、従来よりも極めて優れた影響除去能を示す。このため、例えば、赤血球中の糖化ヘモグロビンの測定に適用すれば、従来よりも測定精度が向上し、糖尿病診断等の指標物質としての重要性がさらに向上する。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 信頼性に優れた糖化アミンの測定を可能にすることを目的とする。

【解決手段】 試料にフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ (FAOD) を添加して、前記試料中に測定対象糖化アミンとは別に存在する非測定対象物である糖化アミンを除去した後、前記試料に、プロテアーゼを添加して、前記測定対象糖化アミンを分解させ、前記分解物とすでに添加された前記FAODとを反応させ、この酸化還元反応を測定することにより糖化アミンの量を測定する。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 3 - 4 1 5 3 0 4

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 1 4 1 8 9 7]

1. 変更年月日

2 0 0 0 年 6 月 1 2 日

[変更理由]

名称変更

住 所

京都府京都市南区東九条西明田町 5 7 番地

氏 名

アークレイ株式会社

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP04/018503

International filing date: 10 December 2004 (10.12.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2003-415304
Filing date: 12 December 2003 (12.12.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 17 February 2005 (17.02.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse